

This Page Is Inserted by IFW Operations
and is not a part of the Official Record

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images may include (but are not limited to):

- BLACK BORDERS
- TEXT CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- FADED TEXT
- ILLEGIBLE TEXT
- SKEWED/SLANTED IMAGES
- COLORED PHOTOS
- BLACK OR VERY BLACK AND WHITE DARK PHOTOS
- GRAY SCALE DOCUMENTS

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

**As rescanning documents *will not* correct images,
please do not report the images to the
Image Problems Mailbox.**

新規痔疾治療薬 Neriproct のラット痔疾モデルにおける抗炎症効果

西木 克伸, 工藤 大悟, 西永こずえ
岩井 克己, 中川 英彦

日本シェーリング(株) 医薬研究開発本部 研究部*
(昭和63年6月13日〔特〕)

要約: クロトン油混合液 (CWPE) 誘発痔疾モデルラットの肛門内にクリーム剤として diflucortolone valerate (DFV), prednisolone (PS), hydrocortisone caproate (HC), hydrocortisone (H) を投与した時, DFV が最強の抗炎症効果を示した。この DFV の抗炎症効果は lidocaine (LDC) の配合によって影響を受けなかった。一方, 炎症局所での LDC の鎮痛効果は DFV との配合により DFV の消炎作用に基づく発痛閾値の正常化と相俟って見かけ上延長された。すなわち, DFV と LDC の配合により, LDC のもつ速効性の鎮痛作用に加えて DFV の消炎作用に起因する遅効性の鎮痛効果も期待しうることが示された。これらの結果と一致して, DFV と LDC の配合剤 Neriproct® は CWPE 痔疾モデルのみならず, 擦過刺激痔疾モデルでも, HC を含有する Scheriproct®, H を含有する Proctsedyl® と Posterisan forte®, グルココルチコイドを含有しない Borraza G®, Borraginol N®, Posterisan® などの痔疾治療剤よりも強い抗炎症作用を示した。CWPE 処置直後に Neriproct® クリームを投与したラットの直腸組織の顕微鏡観察では, 粘膜上皮の剝離, 粘膜層の壊死, 炎症性細胞の浸潤, うっ血などが著しく抑制され, 抗炎症効果を裏付ける組織所見が認められた。Neriproct® の CWPE 痔疾モデルでの抗炎症効果にはクリーム剤と坐剤とで差が見られなかった。創傷治癒抑制作用も抗炎症作用と同様に DFV が PS, HC, H よりも強かったが, 両作用の効力比 (創傷治癒抑制 ID50/炎症抑制 ID50) は DFV が最大であり, 他のグルココルチコイドに比して安全域が広いと推測された。

緒 言

痔疾の本態は静脈瘤の形成にあるといわれているが, 痔疾の主要症状一疼痛・出血・脱出の出現を静脈瘤形成にのみ帰することは不可能である。上記の三症状に共通した因子として炎症がある。炎症が高じて歯状腺よりも肛門側に波及したため, 出血に加えて疼痛が感じられたり, 浮腫性腫大が生じたために脱出して還納し難くなったりする可能性も指摘されている^{1,2)}。このような痔疾病態の観察にもとづき, 抗炎症剤や局所麻酔剤を局所適用する局所保存療法が頻用され, 特にグルココルチコイドを含有した痔疾製剤が急性炎症症状の治療に極めて有用とされている^{3,4)}。また外科的手術の適応となる痔瘻を除き, その他の痔疾は局所保存療法で十分に治療可能といわれている⁵⁾。

痔疾製剤で抗炎症成分として利用されてきたグルココルチコイドは hydrocortisone caproate (HC), hydro-

cortisone (H), prednisolone (PS) であるが, 本研究での被験剤 Neriproct® は diflucortolone valerate (DFV) を含有している (表1参照)。DFV は各種炎症動物モデル^{6,7)}ばかりでなく, 臨床試験⁸⁻¹²⁾でも強い抗炎症作用が立証されている。臨床試験での効力比較では H や PS が "weak" であるのに対し DFV は "very strong" に分類されている¹⁰⁾。しかし DFV は副作用が少なく^{8,13)}, その安全性は「特許に値する」⁹⁾と評されている。

痔疾治療剤 Neriproct® は抗炎症成分として DFV を, 鎮痛成分として lidocaine (LDC) を配合したものである。本報告では, これらの各配合成分の抗炎症効果と鎮痛効果, ならびに配合の意義について記述する。

実験材料および実験方法

1. 実験動物

Sprague-Dawley 系雄性 SPF ラット (体重約 140~300 g) を日本クレアより購入し, 室温 22±2°C, 湿度 55±10%, 明暗サイクル12時間の人工照明条件下で固型飼

* 532 大阪市淀川区西宮原2-6-64

Table 1 Hemorrhoid drugs and their dosage form and active ingredients used in this study

Category	Product name	Dosage form	Active ingredient ^{a)}
Steroid-containing	Neriproct	Cream	Diffucortolone valerate, 0.2 mg; Lidocaine, 40 mg (in 2 g)
		Suppository	Same as that of the cream (in 1.8 g)
	Scheriproct	Ointment	Hydrocortisone caproate, 4 mg; Dibucaine HCl, 5 mg; Clemizole undecylate, 10 mg; Hexachlorophene, 5 mg (in 1 g)
		Ointment	Hydrocortisone, 5 mg; Esculose, 10 mg; Fradiomycine sulfate, 7.1 mg (in 1 g)
	Proctosedyl	Suppository	Same as that of the ointment (in 1.84 g)
		Ointment	Hydrocortisone, 2.5 mg; dead <i>E. coli</i> , 2.66 × 10 ⁸ cells (in 1 g)
Steroid-free	Borrazza G	Suppository	Tribenoside, 200 mg; Lidocaine, 40 mg (in 1.77 g)
	Borriginol N	Suppository	Shikon extract, 0.18 mg; Ethylaminobenzoate, 20 mg; Dibucaine HCl, 0.5 mg; Diphenhydramine HCl, 0.5 mg; Cetrimide, 2.5 mg (in 1.75 g)
		Ointment	Same as that of the suppository (in 2 g)
	Posterisan	Suppository	Dead <i>E. coli</i> , 2.66 × 10 ⁸ cells (in 1 g)
		Ointment	Same as that of the suppository (in 1 g)

a) Cited from the description in the packing insert (specification notice) of each product (except Neriproct).

料 (CE-2, 日本クレア) と水を自由に摂取できるようにして, 1 週間以上予備飼育した後に実験に供した。

2. カラゲニン/カオリン混合起炎剤の調製

蒸留水にラムダ・カラゲニン (10%) とカオリン (2%) を加えて均一の懸濁液となるよう攪拌調製した¹⁴⁾。

3. 被験薬と調製方法

diffucortolone valerate (DFV), lidocaine (LDC), hydrocortisone caproate (HC), hydrocortisone は Schering AG (西ドイツ) より入手し, prednisolone (PS) は Sigma 社製を購入し, 下記の如くクリーム剤として試験に供した。製剤薬効比較試験では Neriproct[®] および Scheriproct[®] (日本シェーリング), Proctosedyl[®] (ルセル・メディカ), Posterisan forte (マルホ製薬), Posterisan[®] (マルホ製薬), Borrazza G[®] (武田薬品工業), Borriginol N[®] (武田薬品工業) の市販品を購入使用した。用いた製剤の剤型と薬効成分を表 1 に示した。その他用いた試薬は, 和光純薬あるいは還元化学から購入した特級品である。

1) クリーム剤

被験薬としてグルココルチコイドを用いる場合には, メノー乳針を用いネリゾナ・ユニバーサル・クリーム基

剤 (日本シェーリング) に充分混和し, 所定濃度となるよう調製後, 1 ml プラスチック製注射器に吸引採取した。注射筒先端部を肛門に挿入し, クリーム剤 150 mg を注入することで薬剤投与を行った。軟膏製剤を被験試料として使用する場合も同様に注射器によって投与した。

2) 坐 剤

市販坐剤を約 50°C に加温して溶融状態とした後, 直径 4 mm の薄いプラスチック製のストローにとり, 氷冷して再成型した。1 個 150 mg となるように切断しラット用坐剤とした。基剤対照として Witepsol-W35 (Dynamit Nobel AG, 西ドイツ) を同様に成型して用いた。

4. クロトン油混合起炎剤 (CWPE) 誘発痔疾モデル

前報¹⁵⁾に従い蒸留水: ピリジン: エーテル: 6% クロトンオイル/エーテル (1:4:5:10) 混液を調製した。この起炎剤 (CWPE) 0.16 ml を浸した綿球 (ジョンソン綿棒, Johnson & Johnson) をラット肛門管部に挿入して起炎した。直ちにクリーム剤または座剤を肛門部に投与し, ラットが薬剤をなめ取らないようにロート型ネckレス¹⁶⁾を首にはめて個別ケージに放置した。被験

剤投
管部
門係

1

こ

ある。

5. 1

前

した。

が坐

肛門

で接

と同一

6. 痔

起炎

した組

ン/エ

光学工

7. 足

ラッ

ン混合

(carbo

混合液

に投与

足趾

製) で

刺激剤

した。

(すなわ

0.5, 1,

8. 創

エー

皮膚を

mm) 7

験部位

手術糸

に 1 日

瘻の度

試験

25 mm

糸を抜

鉛子を

日本光

た。ス

study

idocaine,

8 g)

ibucaine

, 10 mg;

, 10 mg;

1 g)

1.84 g)

coli, 2.66

10 mg (in

niboben-

0.5 mg;

trimide,

n 2 g)

g)

n 1 g)

(except

濃度となる

吸引採取し

剤 150 mg

剤を被験試

で投与し

した後、直

に、水

に切断し

psol-W35

型して用

モデル

6%クロ

製した、

ジョンソ

管部に挿

を肛門部

ポート型

た、被験

剤投与 6 時間後に断頭屠殺し、前報¹³⁾と同様に直腸肛門管部を 13 mm 摘出するとともに、次式に従って直腸肛門係数 (RAC) を算出し、炎症の程度の指標とした。

$$RAC = 10^3 \cdot W_{ra} \cdot W_b^{-1}$$

ここで W_{ra} は直腸肛門管部の湿重量、 W_b は体重である。

5. 擦過刺激痔疾モデル

前田と水沢¹⁴⁾の方法に従って直腸肛門部に炎症を惹起した。擦過刺激直後に被験剤を同部に投与した。被験剤が坐剤の場合には 5 mmφ×10 mm のプラスチック栓を肛門に挿入し、外科用フロンアルフ (東亜化成工業) で接着封鎖した。他の処置は CWPE 痔疾モデルの場合と同様の方法で行った。

6. 病理組織学的検索

起炎処置直後に被験剤を投与し、その 6 時間後に摘出した組織に前報¹³⁾と同様にブアン液固定・ヘマトキシリン/エオジン染色を施し、光学顕微鏡 (Biophoto, 日本光学工業) で観察、写真撮影した。

7. 足趾部での浮腫と疼痛閾値の測定

ラット後肢足趾部皮下に 0.1 ml のカラゲニン/カオリン混合起炎剤を投与し、5 時間 30 分後に 0.5% CMC (carboxymethylcellulose Na) と 0.04% Tween 80 の混合液に懸濁した被験薬 0.5 ml/kg を起炎剤と同一箇所投与した ($n=11$)。

足趾容積を水置換式¹⁵⁾ラット足趾容積測定装置 (自家製) で、疼痛閾値は Randall-Selitto 法¹⁶⁾ (ラット川庄刺激鎮痛効果測定装置 MK-300 型、室町機械) で測定した。これらの測定は起炎剤投与前、被験薬投与直前 (すなわち起炎剤投与 5 時間 30 分後) および被験薬投与 0.5, 1, 2, 3, 4, 6, 24 時間後に行った。

8. 創傷治癒へのグルコルチコイドの影響

エーテル麻酔下でラットの背部を剪毛し、背部正中皮膚を引いて皮膚が二重になった部分にノミ (刃幅 15 mm) で貫通創を作った。これを背部 2 箇所につくり、試験部位を計 4 箇所設けた。各傷口の中央部 1 箇所だけを手術糸で結び、被験クリーム剤 20 mg を試験部位ごとに 1 日 2 回 6 日間塗布し、最終塗布約 16 時間後に創傷治癒の度合を以下の方法で測定した。

試験部位の傷口ははいるようにラット皮膚を約 13×25 mm の長方形に切り出し、傷口の中央を押えている糸を抜き取った後、傷口をはさんで対峙する位置に小形鉗子をかけ、一方を固定したストレンゲージ (TB-611T, 日本光電) に結び、他方を定速 (27 mm/min) で牽引した。ストレンゲージにかかる緊張力の変化をペン書レコ

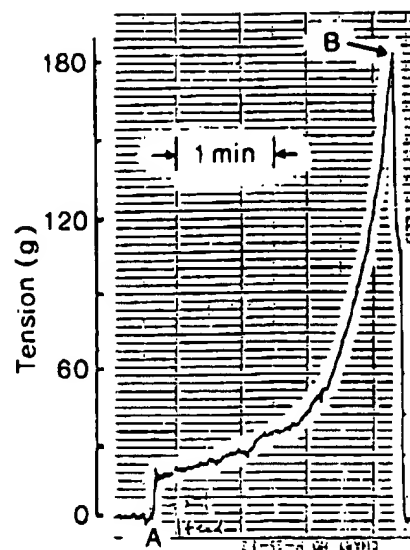


Fig. 1 A typical example of the "skin-stretching" test. The wound, a 15 mm slit, was made on the back of the rat and topically treated with a daily dose of 20 mg cream containing hydrocortisone (0.4%)/site for 6 days. At point A, a rectangular patch of the skin bearing a healing wound, on its center, was subjected to a continuous stretching at a speed of 27 mm/min. When the force applied to the skin specimen attained to approx. 180 g (point B), the wound split and the tension dropped down to zero.

ード (B-381H, 理化電機) に記録した。この記録の典型例を図 1 に示した。時間経過と共に緊張力は増加し、傷口が開裂すると緊張力は急激に低下する。この傷口開裂に要する牽引力を測定し、治療の程度の指標とした。

9. 統計処理

一元配置分散分析を行ない、各群の例数が同じときは Tukey の比較、異なるときは Scheffe の比較により検定した。

実験結果

1. CWPE 痔疾モデル

1) ステロイドの抗炎症効果

CWPE 処置直後、クリーム基剤に混入した DFV, HC, H, PS を肛門管内に投与し、その 6 時間後に摘出した直腸肛門部の直腸肛門係数 (RAC) により算出した炎症抑制率を各被験薬の濃度に対してプロットした (図 2)。いずれの被験薬でも濃度の上昇にともなって炎症抑制率の増強が認められ、その効果の ID50 値は DFV で 0.0001%, PS で 0.091%, HC で 0.76%,

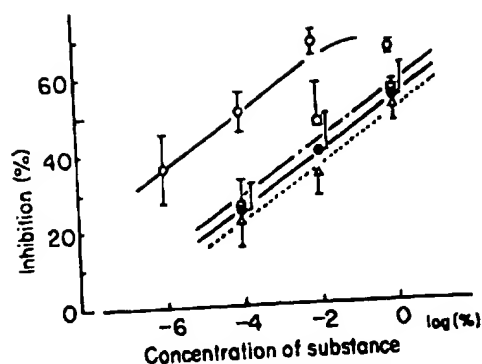


Fig. 2 Comparisons of DFV with several glucocorticoids in their anti-inflammatory activity. The glucocorticoids prepared in a cream base were intrarectally administered to the rats of the CWPE-hemorrhoid model. The recto-anus portion was excised 6 hr after CWPE application and its wet weight measured. The difference between RACs of intact and CWPE-applied (but non-medicated) animals was taken as 100 % of the inflammation range. Each plot shows the mean value \pm S.E. (n=5). \circ , diflucortolone valerate; \square , prednisolone; \bullet , hydrocortisone; \triangle , hydrocortisone caproate. Recto-anus coefficient (RAC) = $\frac{\text{Recto-anus wet weight (g)} \times 1,000}{\text{Body weight (g)}}$

II で 0.33% であった (表 8 参照).

2) 痔疾用製剤の抗炎症効果

Table 2 Comparisons of Neriproct with other steroid-containing hemorrhoid-drugs in inhibitory capability on the development of CWPE-induced recto-anus inflammation of rats

Treatment	Wet wt. of rectum (mg)	RAC ^{a)}	Inhibition ^{b)} (%)
None	375 \pm 11	2.78 \pm 0.12	0
Cream base	310 \pm 11	2.22 \pm 0.08	30
Neriproct ^{c)}	214 \pm 6	1.57 \pm 0.05**	65
Scheriproct	220 \pm 12	1.64 \pm 0.08**	62
Proctosedyl	251 \pm 14	1.79 \pm 0.11*	54
Posterisan forte	257 \pm 16	1.87 \pm 0.11	49

Values in the second and third columns are means \pm S.E. (n=7). a) RAC (Recto-anus coefficient) = $\frac{\text{Recto-anus wet weight (g)} \times 1,000}{\text{Body weight (g)}}$

was calculated from the mean values of RAC, taking the difference between intact rat (wet weight of rectum, 129 \pm 5 mg; RAC, 0.93 \pm 0.04) and none group as 100%. c) Preparation in cream. The other substances are prepared in ointment. *P<0.05, **P<0.01, statistically significant difference from the cream base group.

CWPE 誘発直腸肛門部炎症に対する Neriproct[®] クリーム (150 mg) の抑制効果は、市販のステロイド含有痔疾用製剤 Scheriproct[®] 軟膏とほぼ同等であり、Proctosedyl[®] 軟膏、Posterisan forte[®] 軟膏よりも強い傾向を示した (表 2)。また、非ステロイド含有痔疾用製剤 Posterisan[®] 軟膏、Borriginol N[®] 軟膏との比較では Neriproct クリームは統計的に有意に強い抗炎症効果を示した (表 3)。

3) 効力比較の組織学的検討

正常ラットの直腸では組織全体に浮腫様所見は全く認められず、リーベルキーン腺 (CL) 輪状筋まで達しており、粘膜下組織はほとんど認められなかった (図 3-A)。リーベルキーン腺は粘膜層で密集しており、それを構成している細胞の核は明瞭に染色されているが、中空となっている所見が特徴的である (図 3-A, B)。これに対して CWPE 処置 6 時間後の直腸では、粘膜層 (MM) や粘膜下組織 (SML) で浮腫が著明であり、リーベルキーン腺間隙が広がっていると共に、同腺の細胞が強い壊死像を呈した (図 4-A)。うっ血状態で拡張した血管 (V) やリーベルキーン腺消失箇所が粘膜層に認められた。粘膜上皮 (ME) の剥離が顕著であり、腸管内のほとんど全周にわたって脱落が見られた。うっ血した血管では動脈 (図 4-B) でも静脈 (図 4-C) でも血球の凝集像が認められた。

CWPE 処置直後に Neriproct[®] クリーム (150 mg) を肛門内に投与した群 (図 5-A, B) では図 4 で観察

された病
(ME) は
の、脱
所見を呈
したが、う
ルキーン
むしろ濃
一方、
への白血
態が消失
A の P を
白血球の
つつある
球の貪食
れた。さ
6-A, E
2. 検過
1) 軟
擦過刺
の抗炎症
に起因す
1). 中で
し、She
与群で
ステロ
のみ有
Borriginol
クリーム
4, Exp
2) !
ステ

Table 3 Comparisons of Neriproct with steroid-free hemorrhoid-drugs in inhibitory activity on the development of CWPE-induced recto-anus inflammation of rats

Treatment	Wet wt. of rectum (mg)	RAC	Inhibition (%)
None	374 ± 9	2.68 ± 0.08	0
Cream base	310 ± 15	2.14 ± 0.11	33.3
Neriproct	228 ± 11	1.62 ± 0.08*	65.4
Posterisan	312 ± 13	2.25 ± 0.11	26.5
Borriginol N	332 ± 25	2.32 ± 0.17	22.8

Refer to the legend of Table 2 for details. * $P < 0.05$, statistically significant difference from the cream base group. Wet weight of the rectum was 147 ± 9 mg and RAC was 1.06 ± 0.04 mg/g in intact rats.

された病変が著しく抑えられた。すなわち、粘膜上皮 (ME) は一部剝離した箇所が認められた (図 5-A) もの、脱落は著しく抑えられ、粘膜固有層に保持された所見を呈した (図 5-B)。血管 (V) は拡張傾向を示したが、うっ血像は認められなかった (図 5-A)。リーベルキーン腺と粘膜上皮細胞の核は正常群 (図 3) よりもむしろ濃く染色された (図 5)。

一方、Posterisan 軟膏投与例 (図 6) では、粘膜表層への白血球の遊走が著明であり、リーベルキーン腺の形態が消失した箇所が粘膜層の随所に認められた。図 6-A の P を中心とした領域をさらに拡大した図 6-B では白血球の浸潤を受けて組織形態が不明瞭となり、壊死しつつあるリーベルキーン腺 (CL_a)、完全に壊死して白血球の貪食をうけ始めたリーベルキーン腺 (CL_b) がみられた。さらにうっ血状態の血管 (V) も観察された (図 6-A, B)。

2. 擦過刺激痔疾モデル

1) 軟膏剤の抗炎症効果

擦過刺激痔疾モデルを用いて、ステロイド含有製剤間の抗炎症効果を比較した。これらの製剤は全て擦過刺激に起因する炎症を有意に抑制した (表 4, Experiment 1)。中でも Neriproct® 投与群は約 61% の抑制率を示し、Sheriproct®, Proctosedyl®, Posterisan forte® 投与群でみられた 44~47% の抑制率に比べ高かった。

ステロイド非含有製剤との比較では、Neriproct® のみ有意な抑制 (約 59%) が認められ、Posterisan®, Borriginol N® の抗炎症効果には擦過対照群またはクリーム基剤群との間に有意差は認められなかった (表 4, Experiment 2)。

2) 坐薬剤の抗炎症効果

ステロイド含有坐薬 3 製剤では、上記軟膏剤の場合と

同様、Neriproct® 投与群でのみ炎症悪化が有意に抑制され (表 5, Experiment 1)、Sheriproct® と Proctosedyl® では、炎症抑制作用が Neriproct® よりも弱いと考えられた。

また、Neriproct® ではステロイド非含有坐剤 Borriginol G® よりも強く抑制する傾向が、また Borriginol N® あるいは Posterisan® よりも有意に強く炎症を抑制した (表 5, Experiment 2)。

3) 抗炎症効果の剤型間比較

剤型による効果の差を検討するために、擦過刺激痔疾モデルラットに Neriproct® のクリーム剤と坐剤を投与した。RAC の増加抑制率はクリーム剤で約 67%、坐剤で約 70% であり (表 6)、クリーム剤と坐剤の効果の間には有意差は認められなかった。

3. DFV と LDC の配合の効果

1) DFV の抗炎症作用に及ぼす LDC 配合の影響

擦過刺激痔疾モデルでは、DFV 単独のクリーム剤 (0.01%) 投与群では約 51%、DFV (0.01%) に LDC (2%) を配合したクリーム剤では約 56% の抗炎症効果が得られ、両群の間に有意差は認められなかった (表 7)。

2) 抗浮腫効果と鎮痛効果の同時測定

ラットのカロリン/カラゲニン足趾浮腫モデルにおいて、浮腫が進展し、かつ疼痛閾値が低下した起炎後 5 時間 30 分に被験薬を投与し、浮腫及び疼痛閾値への作用を測定した。各投与群の起炎前値に対する投与直前の足趾浮腫率は $60.4 \pm 3.9 \sim 60.8 \pm 4.6\%$ 、疼痛閾値変動率は $-58.9 \pm 2.9 \sim -54.1 \pm 3.3\%$ であった。これらに対する薬物投与後の経時的な変動率を図 7-A, B に示した。浮腫率は LDC 投与群と溶媒投与群では投与 6 時間後まで減少はみられず、24 時間後でも投与前値よりもわず

Neriproct® ク
自痔疾用製剤
ctosedyl® 軟
を示した (表
Posterisan®
Neriproct
示した (表

見は全く認
まで達して
った (図 3-
おり、それ
いるが、中
い、B)。こ
は、粘膜層
であり、リ
同腺の細
状で拡張
が粘膜層に
であり、腸
に、うっ血
-C) でも
(150 mg)
14 で観察



Fig. 3 Photomicrographs of a cross-section of the rectum in control rats. The rectum was once abraded by a cotton swab soaked with saline. A, The crypts of Lieberkuhn (CL) are cut in oblique section. They are seen to extend down to the muscularis mucosa (Mm). All tissue types, serosa (S), outer longitudinal muscle (OLM), inner circular muscle (ICM) and mucous membrane (MM), are tightly organized and none show edematous characteristics ($\times 100$). B, The crypts (CL) are composed of columnar cells with a hypochromatic nuclei ($\times 200$).

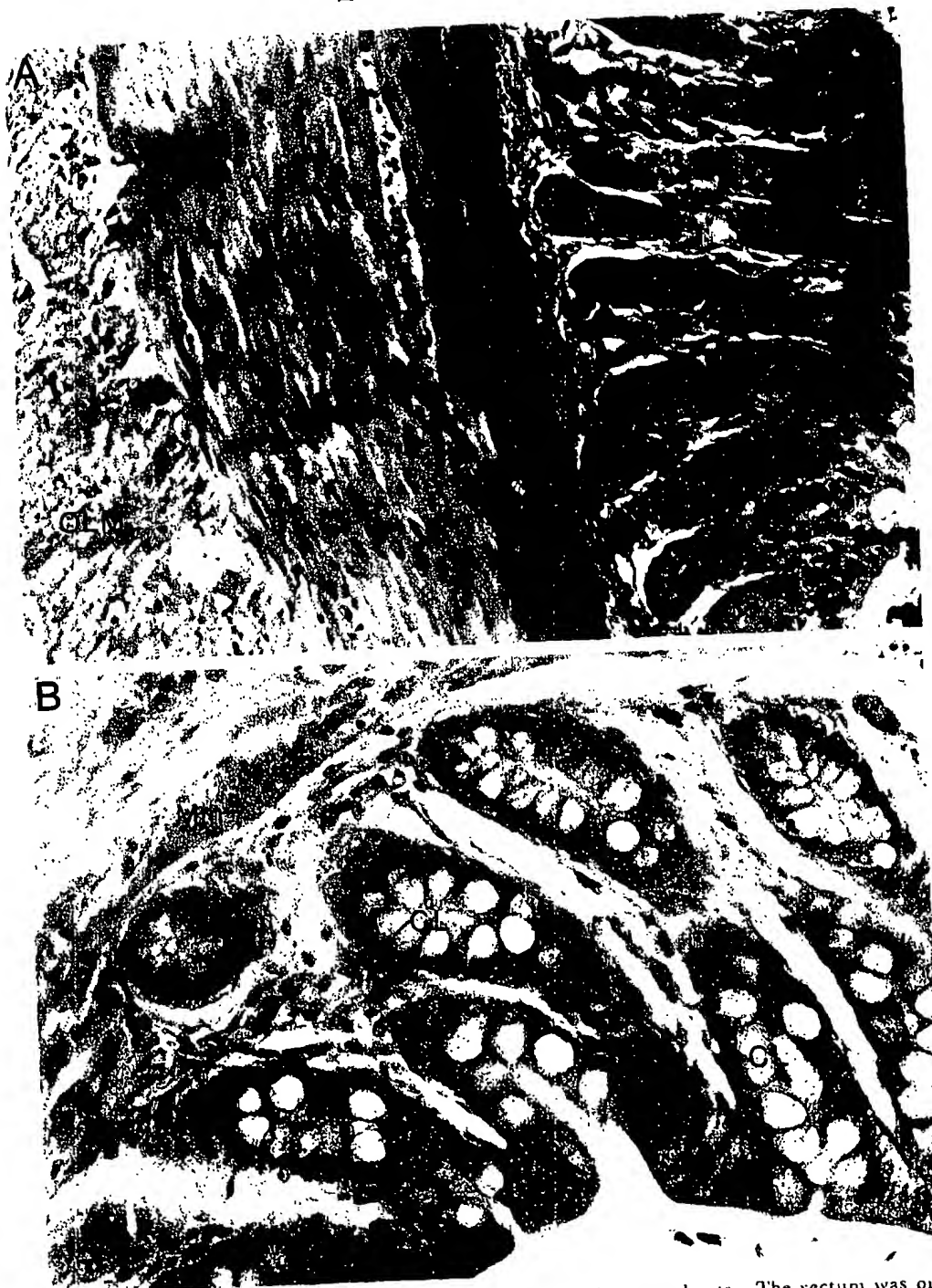


Fig. 3 Photomicrographs of a cross-section of the rectum in control rats. The rectum was once abraded by a cotton swab soaked with saline. A, The crypts of Lieberkuhn (CL) are cut in oblique section. They are seen to extend down to the muscularis mucosa (Mm). All tissue types, serosa (S), outer longitudinal muscle (OLM), inner circular muscle (ICM) and mucous membrane (MM), are tightly organized and none show edematous characteristics ($\times 100$). B, The crypts (CL) are composed of columnar cells with a hypochromatic nuclei ($\times 200$).

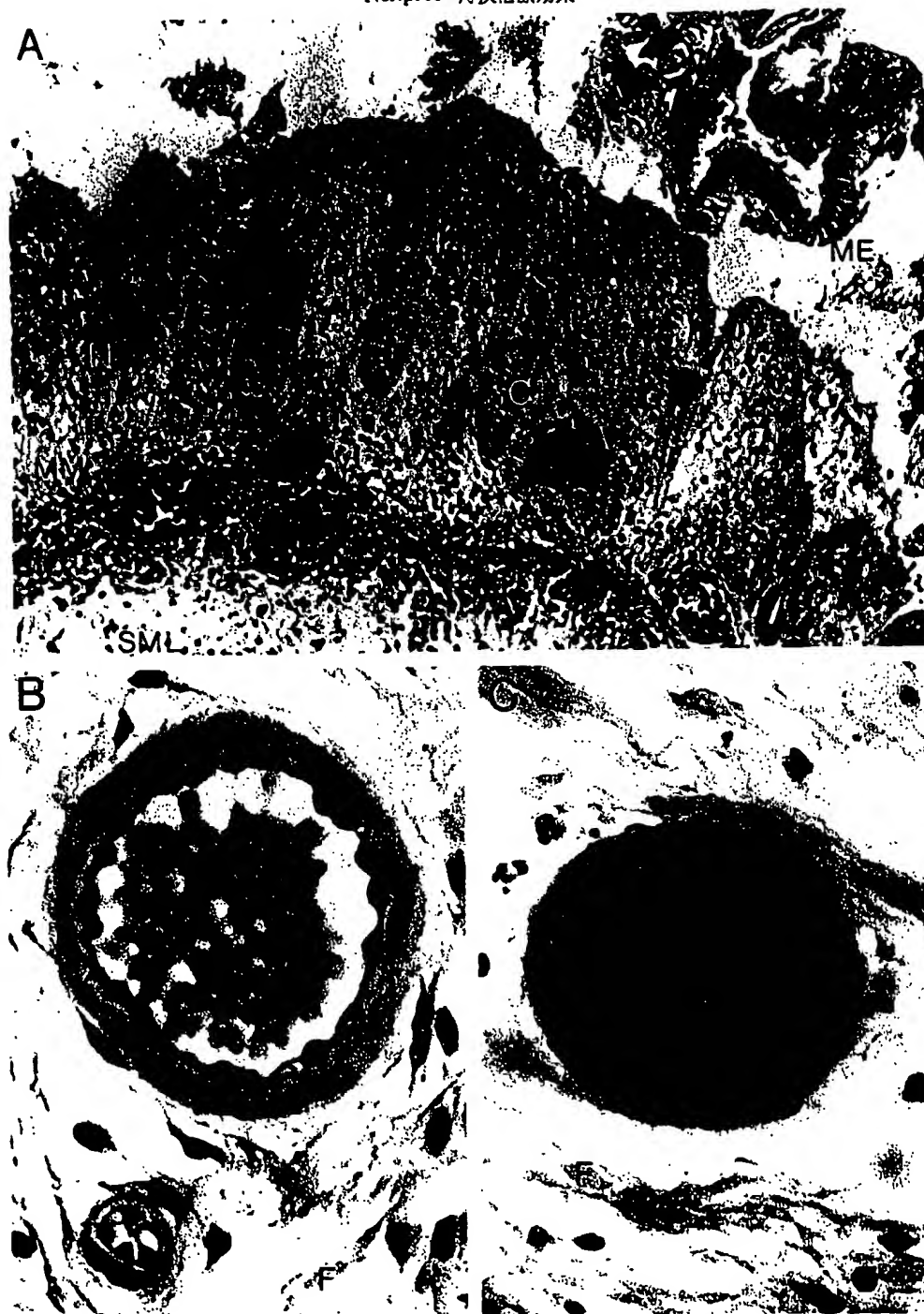


Fig. 4 Photomicrographs of a cross-section of the rat rectum treated with CWPE. A, CWPE causes falling-off mucous epithelium (ME), necrosis of mucous membrane (MM) including crypts of Lieberkühn (CL), vascular dilation and blood congestion (V), and infiltrations of neutrophils (N) and lymphocytes (L) ($\times 100$). B, Dilated arteriole including aggregated erythrocytes ($\times 400$). C, Congested venule in the submucosal space ($\times 400$). Aggregated erythrocytes can be seen in the vasculature. Both vessels are surrounded with fibrin (F) exudated in edema (B, C). SML, submucosal layer.

once
it in
issue
cous
B,

Ncriproct 痢疾治疗效果

233

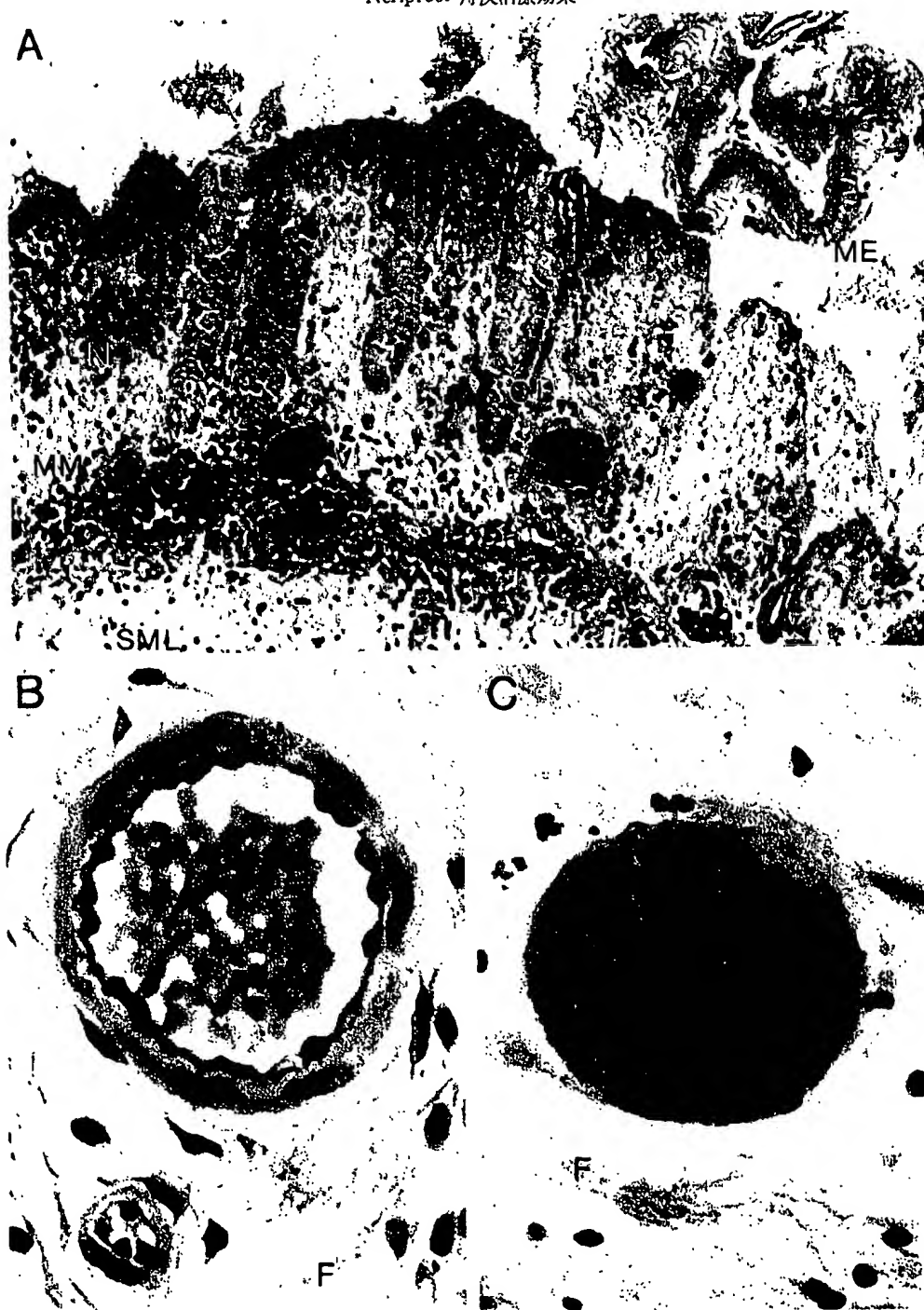


Fig. 4 Photomicrographs of a cross-section of the rat rectum treated with CWPE. A, CWPE causes falling-off mucous epithelium (ME), necrosis of mucous membrane (MM) including crypts of Lieberkuehn (CL), vascular dilation and blood congestion (V), and infiltrations of neutrophils (N) and lymphocytes (L) ($\times 100$). B, Dilated arteriole including aggregated erythrocytes ($\times 400$). C, Congested venule in the submucosal space ($\times 400$). Aggregated erythrocytes can be seen in the vasculature. Both vessels are surrounded with fibrin (F) exudated in edema (B, C). SML, submucosal layer.

once
it in
ssuc
cous
B,

234

西木克術, ほか

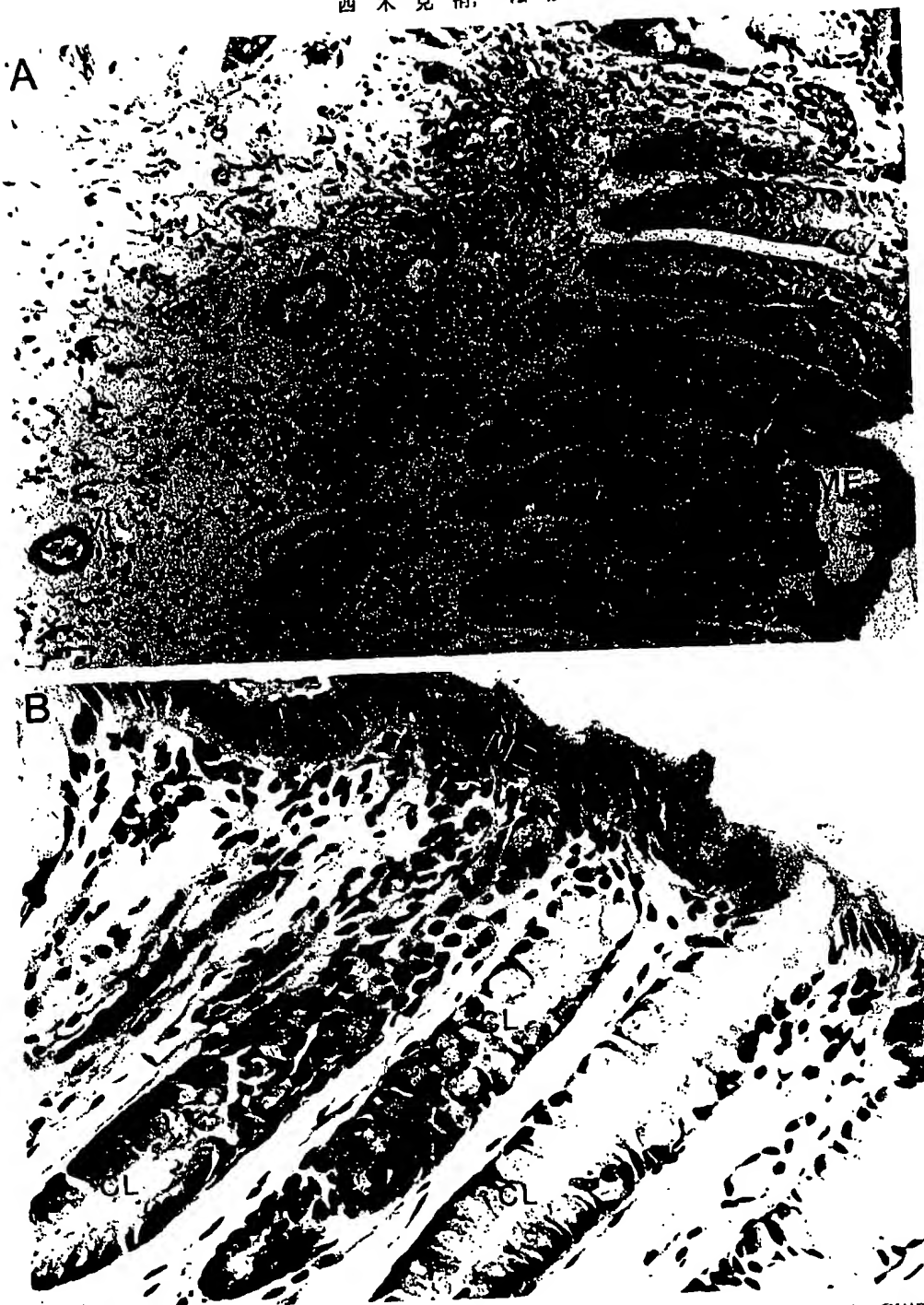


Fig. 5 CWPE-inflamed rectum medicated with Neriproct cream. In comparisons with the CWPE-control in Fig. 4, both photomicrographs A ($\times 100$) and B ($\times 200$) show the hyperchromatic nucleus of crypt (CL) cells, indicating active mitosis. Furthermore, less edema and leucocyte migration are observed in the mucous membrane layer, and vessels (V) are rarely congested. Although subepithelial clefts appear in some parts (Panel-A), the mucous epithelium (ME) is integrated in the other parts of the mucous membrane (Panel-B).

234

西木克信, ほか

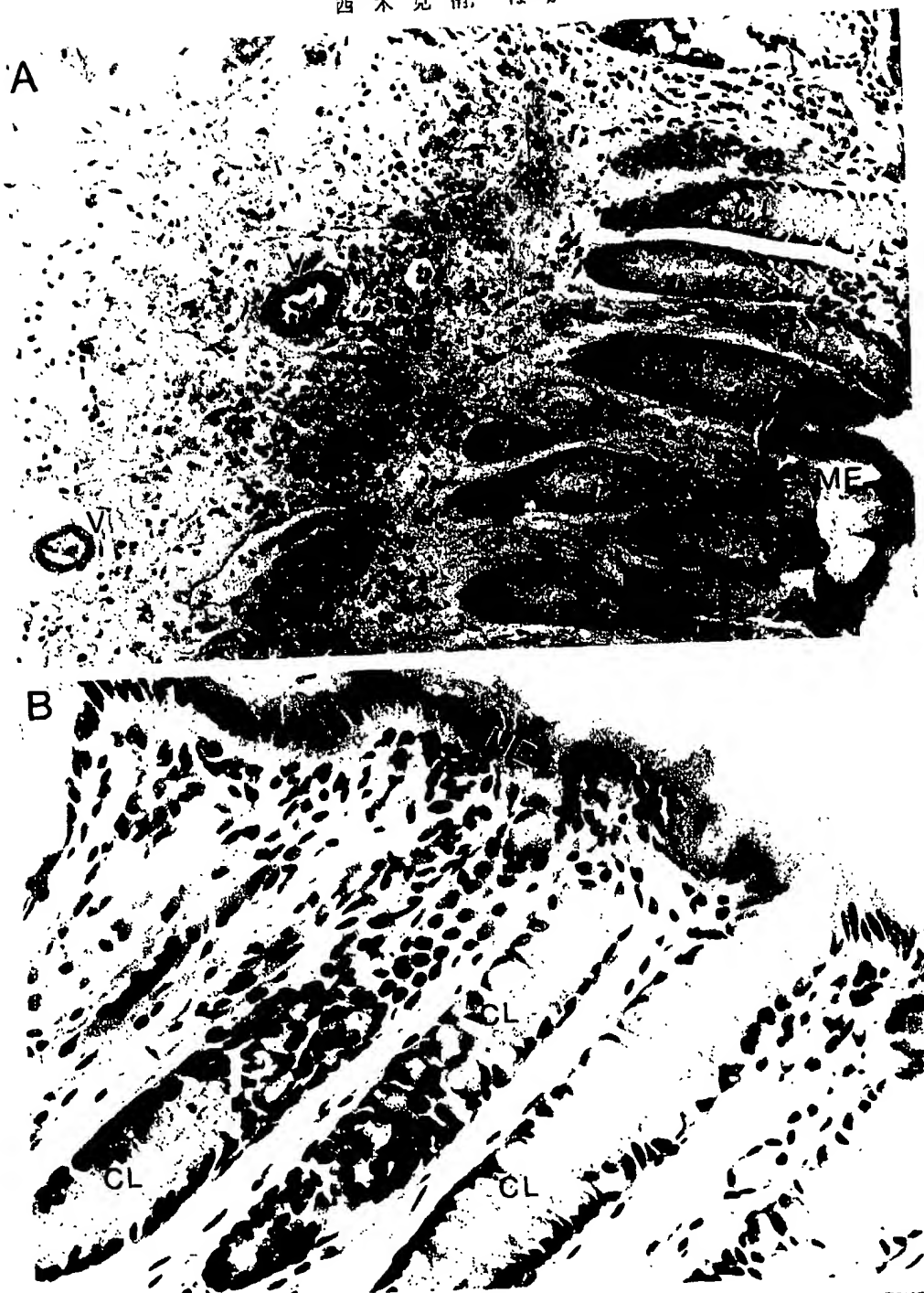


Fig. 5 CWPE-inflamed rectum medicated with Neriproct cream. In comparisons with the CWPE-control in Fig. 4, both photomicrographs A ($\times 100$) and B ($\times 200$) show the hyperchromatic nucleus of crypt (CL) cells, indicating active mitosis. Furthermore, less edema and leucocyte migration are observed in the mucous membrane layer, and vessels (V) are rarely congested. Although subepithelial clefts appear in some parts (Panel-A), the mucous epithelium (ME) is integrated in the other parts of the mucous membrane (Panel-B).

Neriproct 痔疾治療効果

235

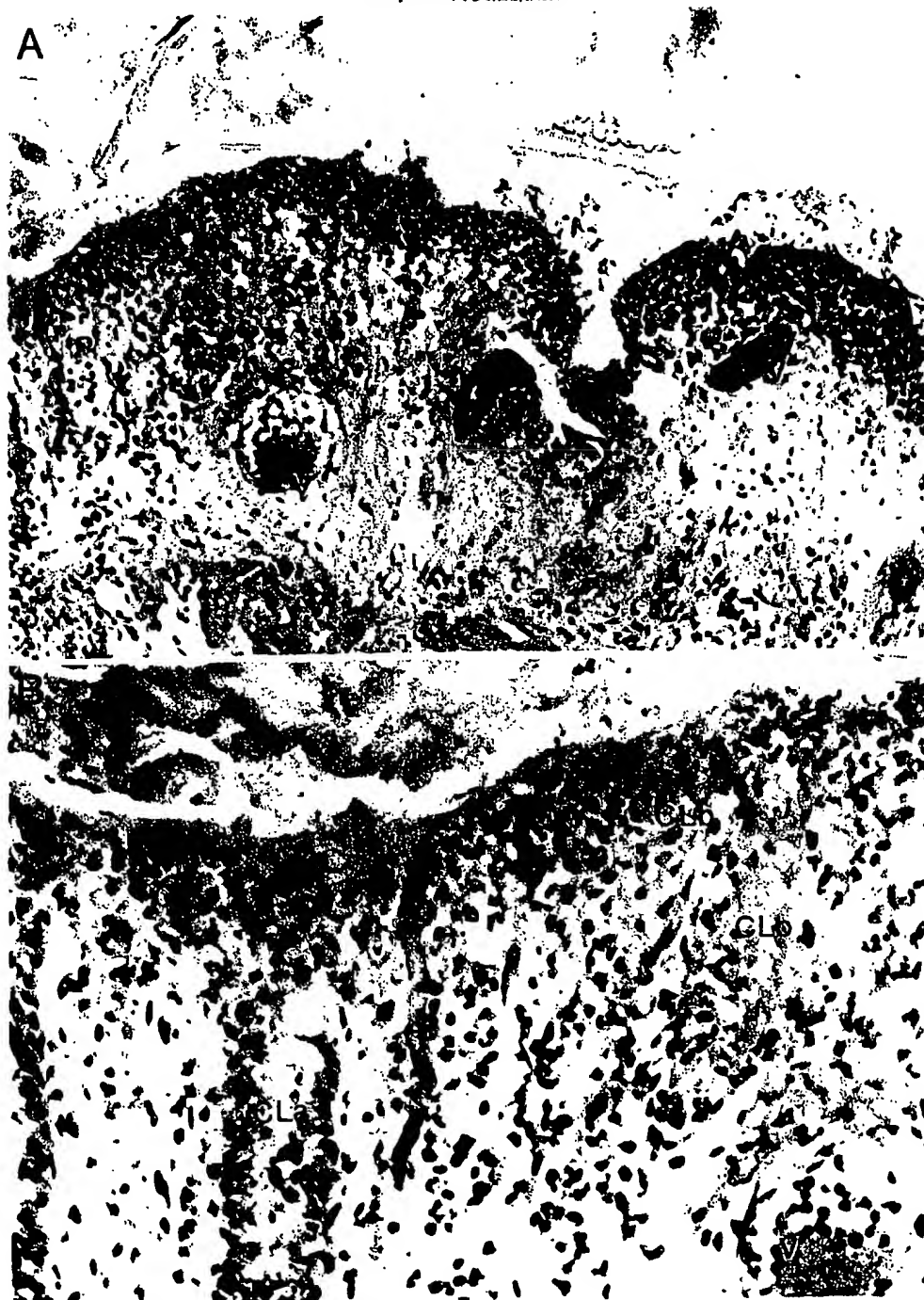


Fig. 6 CWPE-inflamed rectum medicated with Proctosedyl ointment. A large number of neutrophils are concentrated around the surface of the mucous membrane, and some of them emerged out of the membrane. Congested vessels (V) are found in the mucous membrane layer (Panel-A, $\times 100$). Panel-B ($\times 200$) shows a magnified view of the area around "P" indicated in Panel-A. Neutrophils and nuclear debris are composed in CL_a of Panel-B, showing a certain step to meronecrosis of the Lieberkuhn crypt. On the other hand, in CL_b, the neutrophils and nuclear debris disappear for the crypt cells to manifest complete meronecrosis.

Neciproct 痔疾治療効果

235

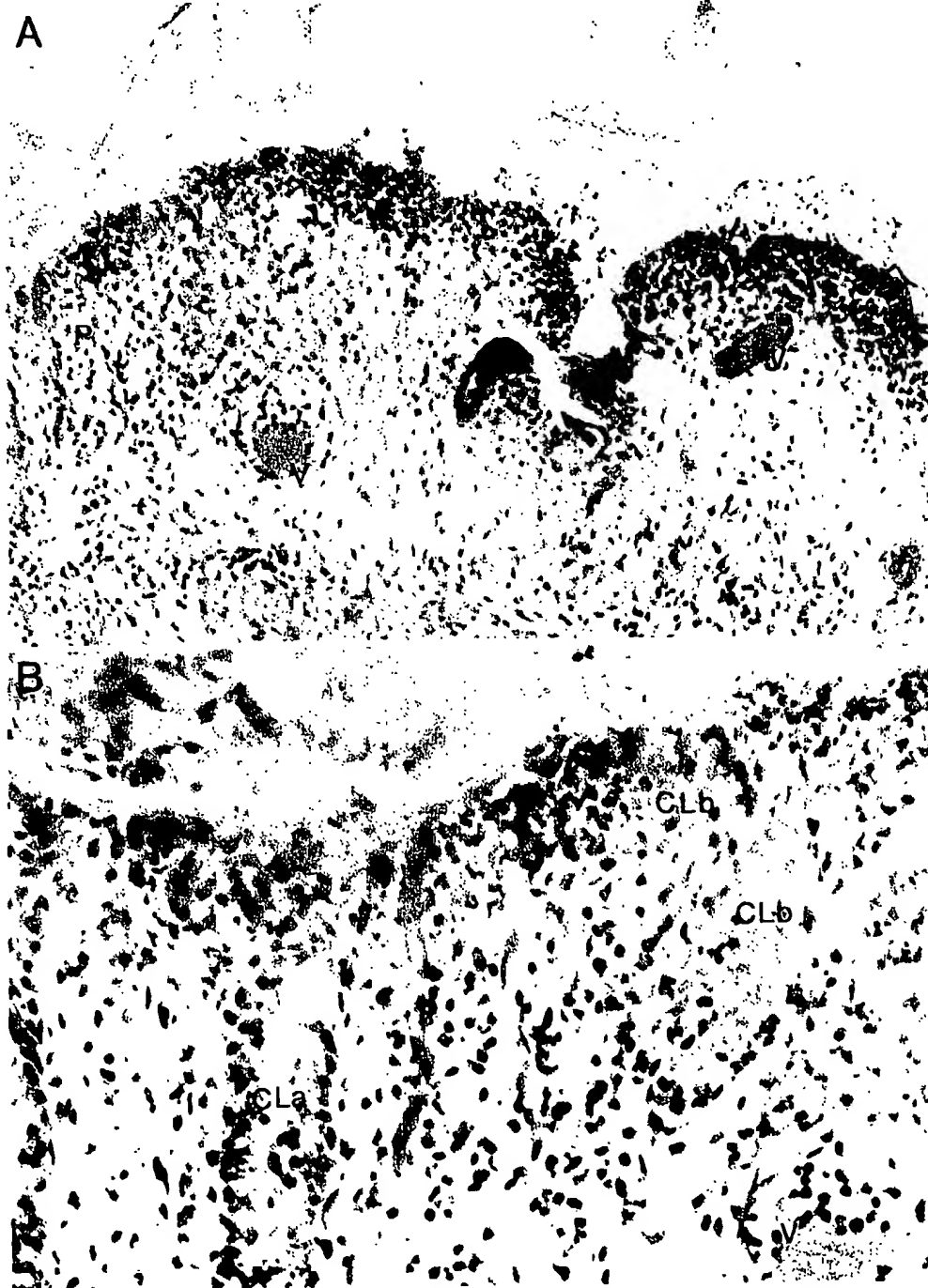


Fig. 6 CWPE-inflamed rectum medicated with Proctosedyl ointment. A large number of neutrophils are concentrated around the surface of the mucous membrane, and some of them emerged out of the membrane. Congested vessels (V) are found in the mucous membrane layer (Panel-A, $\times 100$). Panel-B ($\times 200$) shows a magnified view of the area around "P" indicated in Panel-A. Neutrophils and nuclear debris are composed in CLA of Panel-B, showing a certain step to meronecrosis of the Lieberkuehn crypt. On the other hand, in CLB, the neutrophils and nuclear debris disappear for the crypt cells to manifest complete meronecrosis.

VPE-
natic
ocyte
sted.
) is

Table 4 Comparisons of Neriproct cream with other steroid-containing and steroid-free ointments in inhibitory effect on the inflammation by abrasive irritation of the rat recto-anus portion

Treatment	RAC	Inhibition (%)
<Experiment 1>		
None	2.44±0.16	0
Cream base	2.37±0.15	5.2
Neriproct	1.62±0.09**	60.7
Scheriproct	1.80±0.16*	47.4
Proctosedyl	1.85±0.08*	43.7
Posterisan forte	1.85±0.13*	43.7
<Experiment 2>		
None	2.48±0.13	0
Cream base	2.34±0.10	9.3
Neriproct	1.60±0.05**	58.7
Posterisan	2.09±0.08	26.0
Borriginol N	2.01±0.13	31.3

Values are expressed as the mean±S.E. of 8 rats in Experiment 1 and of 8~9 rats in Experiment 2. RAC for the intact rat was 1.09±0.05 and 0.98±0.05 mg/g in Experiments 1 and 2, respectively. *P<0.05, **P<0.01, statistically significant difference from the cream base group.

かに低下したにすぎなかった。一方、DFV 投与群と DFV+LDC 投与群では被験薬投与1時間後からすでに減少がみられ、24時間後では起炎剤投与前値に回復した(図7-A)。

疼痛閾値は LDC 投与群では被験薬投与30分に最高に達したものの、同3時間後には減少し始め、4時間後に急激に被験薬投与前値にまで低下した。LDC+DFV 投与群では LDC 単独投与の場合と同様に被験薬投与30分後に最高に達し、そのレベルは6時間後でも維持され、24時間後には起炎剤投与前値に回復した。一方、DFV 単独投与群では疼痛閾値は徐々に上昇し、24時間後には起炎剤投与前値にまで回復した。溶媒投与群では投与24時間後でも投与前値に等しい疼痛閾値が維持され、回復はみられなかった(図7-B)。

4. 創傷治癒抑制と抗炎症の効力比

DFV, PS, H, HC のいずれも濃度増加と共に創傷治癒抑制効果が増強された(図8)。正常対照群での裂傷開創重力を50%減少させるのに要するステロイド濃度(ID50 値)は DFV で0.007%, PS で0.20%, HC で

Table 5 Comparisons of Neriproct suppository with other steroid-containing and steroid-free suppositories in inhibitory effect on the inflammation by abrasive irritation of the rat recto-anus portion

Treatment	RAC	Inhibition (%)
<Experiment 1>		
None	2.58±0.21	0
Suppository base ^{a)}	2.46±0.15	7.9
Neriproct	1.65±0.07**	61.2
Scheriproct	1.90±0.10	44.7
Proctosedyl	1.90±0.10	44.7
<Experiment 2>		
None	2.61±0.14	0
Suppository base ^{a)}	2.58±0.12	2.1
Neriproct	1.70±0.05**	62.3
Borriza G	2.12±0.10	33.6
Borriginol N	2.29±0.14	21.9
Posterisan	2.33±0.14	19.2

Values are expressed as the mean±S.E. of 8~9 rats. RAC for the intact rat was 1.06±0.05 and 1.15±0.08 mg/g in Experiments 1 and 2, respectively. **P<0.01, statistically significant difference from the suppository base. a) Witc-psol W 35.

Table 6 Comparisons of dosage forms of Neriproct in inhibitory effects on the inflammation induced by abrasive irritation of the rat recto-anus portion

Treatment	RAC	Inhibition (%)
None	2.66±0.11	0
Cream base	2.66±0.14	0
Suppository base	2.69±0.11	-2.2
Neriproct cream	1.74±0.06	67.2
Neriproct Supp.	1.70±0.04 ^{a)}	70.1

Values are means±S.E. of eight animals. RAC for intact rats was 1.29±0.04 mg/g. a) No significant difference from the Neriproct cream group.

0.63%, H で2.82%であり、DFV の創傷治癒抑制作用が最も強かった。しかし、この ID50 値と CWPE 炎症 ID50 値との比は DFV が被験薬中で最も高い値を示した(表8)。

Tabl
valer
inflar
of th
Trea

Non
Crea
DFV
DFV
Valu
9 ra
mg/g
gled
sal (C
adde
and
crea
of l
the

Percent change in hind paw volume

Table 7 Inhibitory effects of diflucortolone valerate with or without lidocaine on the inflammation induced by abrasive irritation of the rat recto-anus portion

Treatment	RAC	Inhibition (%)
None	2.74±0.11	0
Cream base	2.72±0.18	1.3
DFV ^{a)}	1.94±0.13	50.6
DFV+LDC ^{b)}	1.85±0.08 ^{c)}	56.3

Values are expressed as the mean±S.E. of 8-9 rats. RAC for intact rats was 1.16±0.06 mg/g. a) DFV (diflucortolone valerate), mingled in the base material of Nerisona Universal Cream at 0.01%. b) LDC (lidocaine) was added to the DFV cream. In both the DFV and DFV+LDC groups, the test substance cream was intrarectally administered at a dose of 150 mg. c) No significant difference from the DFV group.

考 察

痔疾治療分野におけるグルココルチコイドの有効性は、疼痛や出血の症状に炎症が合併した、いわゆる痔疾発作の臨床症状を抑えるのに有効である^{1,2,10)}ことや、抗ヒスタミン剤や創傷治癒促進剤のみを含む他剤に比して症状の寛解に要する時間が短い²¹⁻²³⁾ことにあるといわれている。

Neriproct[®]はDFVとLDCの配合剤であるが、配合剤としての作用を検討するのに先立って、各薬効成分の単独作用を測定した。被験薬をクリーム剤としてGWPE痔疾モデルラットの肛門内に投与した今回の試験でも、DFVは対照薬HC、H、PSよりも強い抗炎症効果を示しており、前報¹⁰⁾での結果が追認された。この動物モデルで炎症を50%抑制するのに要するDFV濃度(ID50値)は0.0001%であるのに対し、既報¹⁰⁾の耳浮腫試験ではID50値が0.005%であり、両者の間に50倍の差が認められた。この差は直腸肛門粘膜にはグルココルチコイドの吸収障壁となる角質層がなく、DFVは速やかに炎症部位に作用するためであろうと考えられ

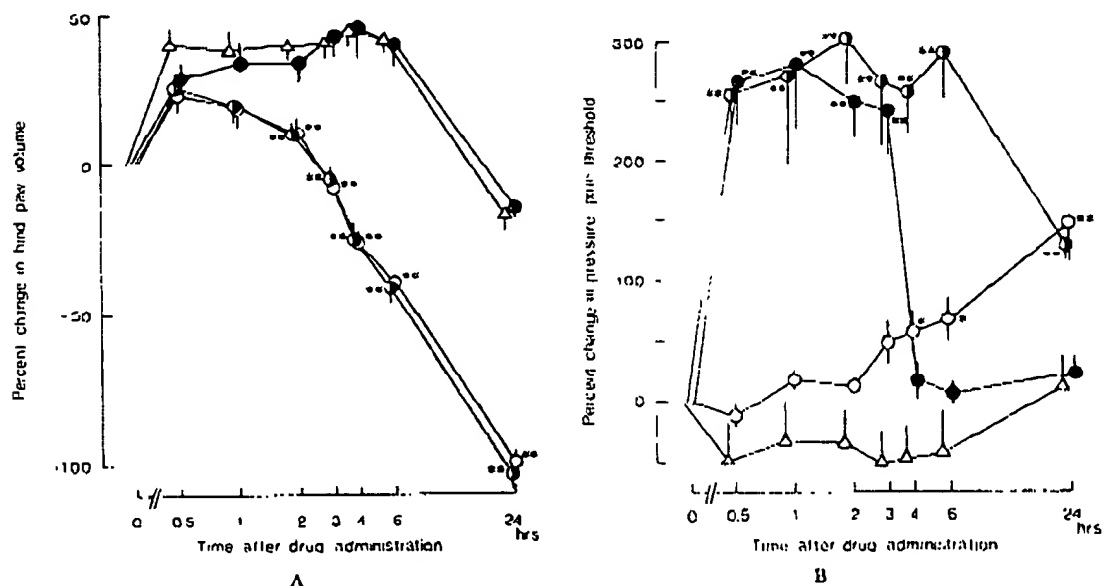


Fig. 7 Effects of DFV/lidocaine. DFV and lidocaine on kaolin-carrageenin-induced hind paw edema in rats. A. Percent change in hind-paw volume. B. Percent change in pressure pain threshold. Each value represents the mean ±S.E. of the change rate from 11 rats based on time-zero (dosing) value. Δ: Control, ○: (DFV 0.3 mg+lidocaine 60 mg)/kg, ●: DFV 0.3 mg/kg, ●: lidocaine 60 mg/kg. *: P<0.05, **: P<0.01, compared with the control group by Tukey's test.

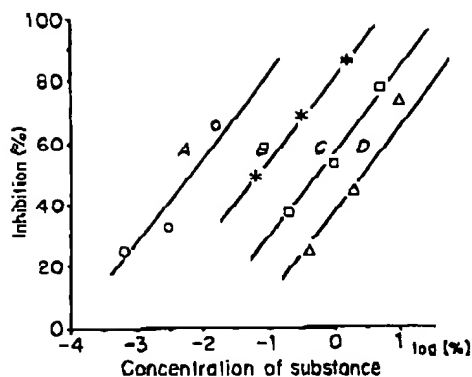


Fig. 8 Inhibitory effects of several glucocorticoids on wound-healing in the dorsal skin of rats. Each point represents the mean value of 3~5 animals. A, DFV; B, prednisolone; C, hydrocortisone caproate; D, hydrocortisone.

る。DFV の直腸内および経皮投与時の最高血中濃度はそれぞれの投与後約 2 時間（東ら，未発表データ），および 18 時間²⁰⁾に認められ，その時の血中濃度 (C_{max}) がほぼ等しい事実も上記の考察を支持している。

Neriproct® の鎮痛成分である LDC の効果を持疾モデルの病巣部位で測定することは困難であった。そこで，炎症部位での疼痛を測定すると共に，炎症をより定量的かつ経時的に追跡するために比較的持続性のあるカタゲヘン・カオリン足跡浮腫を作製し，DFV と LDC との配合の意義を検討した。DFV 単独では抗炎症効果発現までに約 2 時間の潜伏が必要であり，この結果は Tsurufuji ら²⁵⁾ のコルチコイドによる試験結果に近似していた。起炎剤投与局所での発痛閾値は炎症の進展と共に低下するが，2% LDC 投与により上昇し，約 4 時間

後には再び LDC 投与直前値（正常よりも低い閾値レベル）に低下した。DFV 単独では消炎に伴って疼痛閾値の正常化が認められた。これに対して LDC/DFV 併用では LDC 単独で上昇した閾値レベルが長時間持続し，被験薬投与直前値に戻ることなく，起炎剤投与前値にまで回復した。DFV と LDC のそれぞれの薬物動態は配合によって影響されないことを確認している（東ら，未発表データ）ので，両薬物併用により検出された鎮痛効果の延長はグルココルチコイドの血管収縮作用^{26,27)}によって局所での LDC の滞留時間が延長したこと起因するものではないと推えよう。従って両薬物併用による持続的な発痛閾値の上昇は LDC による速効性の局所効果の上に DFV による消炎に伴う炎症痛の緩やかな軽減が相対的に寄与した結果であると考えられる。

DFV/LDC 配合剤 Neriproct® は CWPE 持疾モデル，擦過刺激持疾モデルのいずれでも，HC を含有する Scheriproct® と同等ないしはより強力な抗炎症効果を示し，また，H を含有する Proctosedyl® と Posterisan forte®,あるいはグルココルチコイドを含有しない Posterisan®, Borraza G®, Borraginol N® に比較して強力であった。CWPE 処置直後に Neriproct® クリームを投与したラットの直腸組織では，粘膜上皮の剥離，粘膜層の壊死，炎症性細胞の浸潤，うっ血などが著しく抑制された。さらに，リーベルキーン腺と粘膜上皮細胞は正常よりもむしろ活性化状態にあることが組織学的に認められ，上記の DFV の抗炎症効果を裏付ける所見を示している。Posterisan® 軟膏を投与されたラットでは，起炎部の粘膜表層部への顆粒球（好中球）の浸潤傾向が著明である所見が多くの例で見られ，白血球凝集密度は対照群よりも高かった。これは病巣局所に投与され

Table 8 Inhibitory activity of steroids on wound-healing and its ratio to anti-inflammatory activity

	ID50 values against		B/A ratio	Relative safety ^{a)}
	CWPE-inflammation (A)	Wound-healing (B)		
DFV	0.0001%	0.007%	70.0	100
Prednisolone	0.091	0.20	2.2	3
Hydrocortisone caproate	0.76	0.63	0.83	1
Hydrocortisone	0.33	2.82	8.5	12

The values in columns (A) and (B) were calculated on the basis of the data shown in Fig. 2 and 8, respectively. a) Regarding the B/A ratio of DFV (diflucortolone valerate) as 100, the ratios of the other substances were normalized.

は Posterisan® の現象で，この factor は明である。ph 化の結果，nidase を認められ，果たして CWPE 得られた。床が年中，この条件と動物の抑制作用，しかし，抑制力の低下，す。と，この度で，床が床に

- 1) 後述
- 2) 主成分
- 3) 北
- 4) 吉
- 5) 坂
- 6) 田
- 809
- 7) 林
- (19
- 8) 菅
- 9) 橋
- 10) 武
- 11) 島
- 12) 上

も低い閾値レベルで終結し、創傷修復に要する薬剤動態は配る（東ら、未発表）。創傷修復作用^{26,27}によつて創傷修復作用による創傷修復作用の局所効果は軽減が

PE 痔瘻モデルを含有する抗炎症効果を Posteri- を含有しないに比較して、創傷修復作用の局所効果は軽減が

た Posterisan® に含まれる大腸菌死菌によって誘発された現象であることは、大腸菌死菌の皮下投与での好中球の chemotaxis が観察される事実²⁸からも明らかである。このように病巣部に凝集した顆粒球は chemotactic factor が大腸菌死菌である場合、活性化されるか否か不明である²⁹が、肛門部に塗布された CWPE に含まれている phorbol ester では容易に活性化される³⁰。活性化の結果、顆粒球と共に関与する lysosome や β -glucuronidase 分泌^{31,32} や O_2^- 生成³³ が亢進されることは広く認められており、これらが炎症の進展に重要な役割を果たしているといわれている。Posterisan® 処理した CWPE 痔瘻モデルで病巣部が悪化した組織学的所見が得られた背景には、Posterisan® を塗布した患部に顆粒球が集中し、活性化されたという可能性が推測される。

グルココルチコイドは *in vitro*³⁴, *in vivo*³⁵ のいずれの条件下でも皮膚コラーゲンの生成を抑制し、ヒト³⁶ と動物³⁷ で表面創傷の修復を阻害する。DFV も創傷治癒抑制作用を示し、その効力は IIC, II, PS より強い。しかし、抗炎症作用も強いので、創傷治癒抑制力と炎症抑制力の比は最も大きい。

以上のように DFV は痔瘻モデルで強い抗炎症作用を示す、安全度の高いグルココルチコイドである。DFV と IIC の配合により鎮痛効果の配合の意義が認められる。これらを配合した製剤 Neriproct® は CWPE 痔瘻モデルと擦過刺激痔瘻モデルで数種類の代表的な痔瘻治療剤よりも強い抗炎症効果を発揮しており、痔核に対するより有効な治療効果が期待される。

文 献

- 1) 後藤明彦, 植田英知: 外科 32, 430 (1970)
- 2) 土屋周二: 臨床と研究 50, 2315 (1973)
- 3) 北原哲夫: 治療 51, 1559 (1969)
- 4) 吉雄敏文: 薬理と治療 5, 263 (1977)
- 5) 坂部 栄: 外科診療 28, 407 (1986)
- 6) 山中雄四郎, 前田昌樹, 中村圭二: 応用薬理 12, 809 (1976)
- 7) 林 正, 生駒幸弘, 中河 勇: 日脚医報 22, 299 (1977)
- 8) 菅原 信: 薬理と治療 12, 5681 (1984)
- 9) 植田修一: 薬理と治療 5, 769 (1977)
- 10) 武田克之: 皮膚科臨床 26, 631 (1984)
- 11) 島雄周平: 皮膚病診療 5, 77 (1983)
- 12) 上田恵一, 在田経久, 外松茂太郎: 新薬と臨床 32,

- 782 (1983)
- 13) 安里哲時, 武田克之: 西日本皮膚科 43, 1186 (1981)
- 14) 中村秀雄, 横山雄一, 元吉 悟, 石井勝美, 清水常尚: 日薬理誌 75, 417 (1979)
- 15) 西木克信, 西永こずえ, 工藤大悟, 岩井克己: 日薬理誌 92, 215 (1988)
- 16) 府川和永, 大場誠一, 金塚聡之, 畑中佳一, 入野理: 応用薬理 27, 417 (1984)
- 17) 前田幸英, 水沢英甫: 薬理と治療 5, 1281 (1977)
- 18) Winter, C.H., Risley, E.A. and Nuss, G.W.: Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 111, 544 (1962)
- 19) Randall, L.O. and Scittito, J.J.: Arch. Int. Pharmacodyn. 111, 409 (1957)
- 20) 吉雄敏文, 小林一雄: Curr. Ther. 2, 39 (1984)
- 21) 衣笠 昭, 土屋周二: 基礎と臨床 11, 711 (1977)
- 22) 岩瀬 英: 日脚医報 4, 211 (1959)
- 23) 得能雄雄: 日脚医報 5, 330 (1963)
- 24) 市下浩子, 植崎ミミ子, 田中真知子, 清水宏俊: 薬理と治療 5, 727 (1977)
- 25) Tsurufuji, S., Sugio, K., Takemasa, F. and Yoshizawa, S.: J. Pharmacol. Exp. Ther. 212, 225 (1980)
- 26) Stutrgen, G.: Dermatologis 152, Supp. 1, 91 (1976)
- 27) Thune, F.: Mechanisms of Topical Corticoid Activity, Edited by Wilson, L. and Marks, R., p. 258, Churchill-Livingstone, Edinburgh (1976)
- 28) Koponiak, M.M., Issekutz, A.C. and Movat, H.Z.: Am. J. Pathol. 98, 485 (1980)
- 29) Hoidal, J.R., Repine, J.E., Nedli, G.D., Rosp, F.L. and White, J.G.: Am. J. Pathol. 91, 469 (1978)
- 30) Goldstein, I.M., Hoffstein, S.T. and Weissman, G.: J. Cell Biol. 66, 647 (1975)
- 31) White, J.G. and Estensen, R.F.: Am. J. Pathol. 75, 45 (1974)
- 32) Bass, D.A., Dechatelet, L.R. and McCall, C.E.: J. Immunol. 121, 172 (1978)
- 33) Ponec, M., deHass, C., Kempenaar, J.A. and Bachra, B.N.: Arch. Dermatol. Res. 266, 75 (1979)
- 34) Cutronco, K.R., Costello, D. and Fuller, G.C.: Biochem. Pharmacol. 20, 2797 (1971)
- 35) Uitto, J., Tier, H. and Mustakallio, K.K.: Biochem. Pharmacol. 21, 2161 (1972)
- 36) Winters, G.D.: A Glaxo Symposium on Wound Healing, Edited by Wilson, L. and Marks, R., p. 61, Churchill Livingstone, New York (1972)

Abstract—Neriproct: Its anti-inflammatory effect on an experimentally induced hemorrhoid model in the rat. Katsuyuki NISHIKI, Daigo KUDOH, Kozue NISHINAGA, Katsumi IWAI and Hidehiko NAKAGAWA (Department of Research, Nihon Schering K.K., 2-6-64, Nishimiyaara, Yodogawa, Osaka 532, Japan). *Folia pharmacol japon.* 92, 227~240 (1988)

Several glucocorticoids as a cream formulation were applied to the recto-anns of the croton-oil-induced hemorrhoid rat. Among the steroids tested, i.e. diflucortolone valerate (DFV), prednisolone (PS), hydrocortisone caproate (HC), and hydrocortisone (H), DFV was found to suppress inflammation most effectively. The effect of DFV was not affected by combination with lidocaine. In this model, the analgesic effect of lidocaine was apparently prolonged by an increase of the threshold for pain by the anti-inflammatory effect of DFV. This additive effect is regarded as a merit of the combination in Neriproct®. Therapeutic effects of Neriproct® and several anti-hemorrhoid drugs were also examined by using a hemorrhoid model with abrasive irritation compared to those obtained by the croton-oil model. In both models, efficacy of Neriproct® was superior to that of the other drugs such as Scheriproct®, Proctosedyl®, Posterisan forte®, Borraginol N®, Posterisan® and Borraza G®. Microscopic observation showed that destruction of the mucus epithelium, necrosis of the mucus layer, infiltration of inflammatory cells and vasodilatation in the croton-oil model were also suppressed markedly by Neriproct® application. No difference was observed in the efficacy between the cream and suppository formulation of Neriproct®. Suppression of wound healing was found with a dosage of DFV lower than those of PS, HC and H. However, the efficacy ratio of the wound-healing suppression and anti-inflammation of DFV was the largest among the steroids tested.